

Myeloproliferatívne neoplázie a s nimi súvisiace mutácie

Miroslava Eckertová^{1,2}, Renata Lukačková^{1,2}, Ľubica Majerová^{1,2}

¹MEDIREX GROUP ACADEMY n.o., Nitra

²Medirex, a.s., Oddelenie lekárskej genetiky, Bratislava

Myeloproliferatívne neoplázie (MPN) sú skupinou ochorení hematopoetickej kmeňovej bunky, pre ktoré je charakteristická zvýšená proliferácia jedného alebo viacerých vývojových radov krviniek a tendencia leukemickej transformácie. Na základe klasifikácie Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) z roku 2016 sa medzi MPN bez prítomnosti Philadelphia (Ph) chromozómu a jeho produktu, t. j. fúzneho génu *BCR-ABL1*, zaraďuje polycytémia vera (PV), esenciálna trombocytémia (ET) a primárna myelofibróza (PMF). Mutácia v jednom z troch génov – *JAK2* (mutácia génu pre Janus kinázu 2), *MPL* (mutácia v géne pre trombopoetínový receptor) a *CALR* (mutácia v géne pre kalretikulín) je prítomná vo veľkej väčšine pacientov s klasickou Ph-MPN. Tieto kľúčové somatické mutácie sú zodpovedné za fenotypový prejav ochorenia a ich spoločnou črtou je nadmerná aktivácia JAK/STAT signálnej dráhy, a to aj vrátane „triple“ negatívnych pacientov, u ktorých nie je dokázaná žiadna z uvedených somatických mutácií.

Kľúčové slová: myeloproliferatívne neoplázie, polycytémia vera, esenciálna trombocytémia, primárna myelofibróza, molekulárna diagnostika

Myeloproliferative neoplasms and detection of calreticulin detection

Myeloproliferative neoplasms (MPN) are clonal haematological disorders that lead to the overproduction of one or more myeloid lineages and contribute to disease progression to leukemic transformation. The World Health Organization (2016) includes in Philadelphia – chromosome (Ph) negative MPN diagnosis of polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). Mutations of *JAK2* (gene for Janus Kinase 2), *MPL* (gene for Thrombopoietin Receptor) and *CALR* (gene for Calreticulin) are related to MPN in the majority of patients with classical Ph-MPN. These driver somatic mutations are responsible for disease phenotype and constitutive activation of the JAK/STAT signalling pathway as „triple“ negative patients were termed MPN patients lacking driver mutations, although the JAK/STAT signalling cascade is preserved.

Keywords: myeloproliferative neoplasms, polycythemia vera, essential thrombocythemia, primary myelofibrosis, molecular diagnostics

NewsLab, 2022; roč. 13 (2): 68 – 71

Úvod

Ph (*BCR-ABL1*) negatívne myeloproliferatívne neoplázie (MPN) sú podskupinou ochorení hematopoetickej kmeňovej bunky, pre ktoré je charakteristická následná proliferácia erytrocytovej, granulocytovej alebo megakaryocytovej línie a zvýšená tendencia leukemickej transformácie. S hyperproliferáciou kostnej drene koreluje myeloproliferácia v periférnej krvi a/alebo v slezine. Pre Ph-MPN sú typické zložité molekulárne zmeny, ktoré spôsobujú klinicky rôznorodý priebeh ochorenia s nepriaznivým vplyvom na kvalitu a dĺžku života.

Najčastejšie, tzv. klasické Ph-MPN tvorí polycytémia vera (PV), esenciálna trombocytémia (ET) a primárna myelofibróza (PMF). Sú známe arteriálnymi a venóznymi trombózami, cytopéniou, výraznou splenomegáliou a najmä rizikom prechodu do akútnej leukémie. Somatické mutácie vyskytujúce sa vo väčšine týchto MPN, zahŕňajú *JAK2* mutáciu, *MPL* mutáciu a mutáciu v géne pre *CALR*. Špecifickú skupinu tvoria pacienti, ktorí nevykazujú žiadnu z kľúčových mutácií, na základe čoho sa v literatúre radia k „triple“ negatívnym. Napriek tejto skutočnosti je u nich rovnako ako v prípade MPN pacientov s riadiacimi mutáciami stimulovaná JAK/STAT sig-

nálna kaskáda. Vďaka významným objavom týkajúcim sa mutačných zmien a ovplyvnení JAK/STAT dráhy sa v posledných desaťročiach výrazne zlepšila diferenciálna diagnostika a teda aj samotná liečba pacientov s MPN.

Ako výsledok objavenia mutácií v exóne 9 génu pre kalretikulín, je diagnostika na molekulárnej úrovni schopná odhaliť približne 75 – 90 % klonálnych MPN. Zaradenie skríningu *CALR* mutácií do rutínnej praxe sa stáva esenciálnym z hľadiska diferenciálnej diagnostiky *JAK2* negatívnych MPN a prispieva k odhaleniu fenotypových charakteristík spojených s mutáciami typu 1 a typu 2 génu pre *CALR*.

Diagnostické kritériá MPN

Kritériá pre diagnostiku MPN boli vytvorené a zosumari-zované WHO v roku 2016 a rozdelené na veľké „major“ a malé „minor“ kritériá (tabuľka 1). Pre diagnostikovanie PV musia mať pacienti splnené všetky tri body veľkých kritérií alebo prvé dva z veľkých a malé kritérium. Pre ET musia platiť všetky štyri hlavné kritériá alebo prvé tri z hlavných kritérií a malé kritérium. Pre skupinu pacientov s PMF musia byť v platnosti všetky veľké kritériá a minimálne jedno malé kritérium⁽¹⁾.

Tabuľka 1. Diagnostické kritériá pre MPN podľa WHO.

Polycytémia vera	
Veľké „major“ kritériá	
1. HGB > 16,5 g/dl (muži), > 16 g/dl (ženy) alebo HGB > 49 % (muži) a > 48 % (ženy), alebo zvýšený počet erytrocytov	
2. hypercelularita KD, zvýšená proliferácia erytrocytového, granulocytového radu a maturovaných megakaryocytov	
3. prítomnosť JAK2 ^{V617F} alebo JAK2 exón 12 mutácie	
Malé „minor“ kritériá	
• nefyziologická hladina EPO	
Esenciálna trombocytémia	
Veľké „major“ kritériá	
1. počet trombocytov $\geq 450 \times 10^9/l$	
2. v KD prevažuje proliferácia megakaryocytového radu, veľmi raritne sa môže vyskytnúť retikulínová fibróza ^a	
3. nespĺnené WHO kritériá pre iné myeloidné neoplázie	
4. prítomnosť JAK2 ^{V617F} , CALR alebo MPL mutácie	
Malé „minor“ kritériá	
• prítomnosť klonálneho markera ^b alebo absencia trombocytózy	
Primárna myelofibróza	
Veľké „major“ kritériá	
1. prítomnosť megakaryocytovej proliferácie sprevádzaná retikulínovou fibrózou ^a 2. alebo 3. stupňa	
2. nespĺnené WHO kritériá pre iné myeloidné neoplázie	
3. prítomnosť JAK2 ^{V617F} , CALR alebo MPL mutácie alebo v prípade ich absencie, prítomnosť iného klonálneho markera ^b , alebo neprítomnosť retikulínovej fibrózy ^a v KD	
Malé „minor“ kritériá	
• anémia bez súvislosti s komorbiditami	
• leukocytóza $\geq 11 \times 10^9/l$	
• palpačný nález splenomegálie	
• zvýšená hodnota LDH	

Vysvetlivky: ^aretikulínová fibróza – sieť retikulínových vlákien s prekříženiami (stupne retikulínovej fibrózy: 1. 2. a 3. stupeň), ^bklonálny marker – mutácie ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B1

Skratky: HGB – hemoglobín, KD – kostná dreň, EPO – erytropoetín, LDH – laktátdehydrogenáza

Mutácie sprevádzajúce myeloproliferatívne neoplázie

Mutácie sprevádzajúce MPN sa rozdeľujú na kľúčové alebo riadiace (označované v literatúre aj ako „driver“ mutácie) a na prídavné mutácie.

Kľúčové (riadiace) mutácie myeloproliferatívnych neoplázií

Kľúčové mutácie sú prítomné vo veľkej väčšine pacientov s klasickou Ph-MPN. Somatické mutácie v jednom z 3 génov, t. j. JAK2 (mutácia v géne pre Janus kinázu 2), MPL (mutácia v géne pre trombopoetínový receptor) a CALR (mutácia v géne pre kalretikulín), sú zodpovedné za špecifický fenotyp ochorenia. Nadmerne aktivovaná signálna dráha JAK/STAT je spoločnou patogenetickou črtou Ph-MPN, a to aj vrátane „triple“ negatívnych pacientov, u ktorých nie je dokázaná žiadna z uvedených somatických mutácií⁽²⁾.

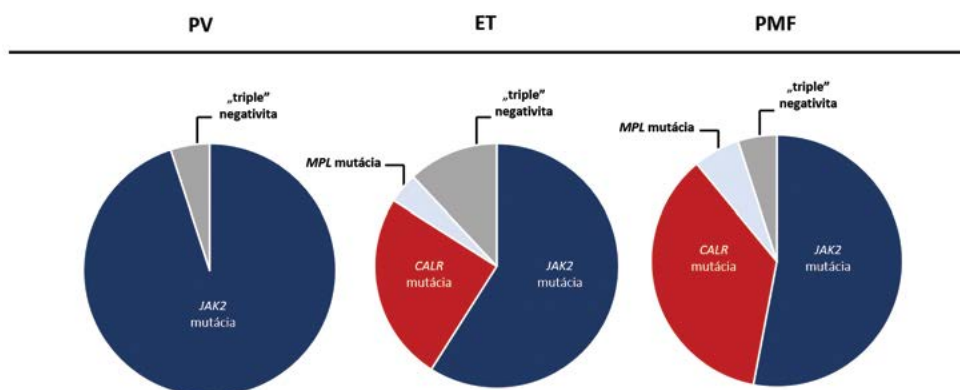
Somatická bodová mutácia JAK2 génu sa predpokladá takmer u všetkých pacientov s PV a v 50 – 60 % pacientov s ET a PMF. Približne 25 % pacientov s ET a 36 % pacientov s PMF má pozitívnu mutáciu v géne pre CALR. Mutácia v géne MPL bola zistená v 4 % pacientov s ET a v 6 % pacientov s PMF, zatiaľ čo „triple“ negatívnych pacientov je asi 5 % pri diagnózach PV a PMF a 12 % pri ET (obrázok 1)⁽³⁾.

JAK2 (Janus kináza 2)

Janus kinázy (JAK) patria do rodiny nереceptorových tyrozínkináz, ktoré asociujú so širokou škálou cytokínových receptorov zahrnutých v bunkovom raste, hematopoéze a imunitnej odpovedi. Za fyziologických podmienok, t. j. za stavu, keď nie je prítomná mutácia, JAK kináza asociuje s receptorovými monomérmi, ktoré po naviazaní ligandu dimerizujú a vedú k fosforylácii a aktivácii JAK kináz. Tie následne fosforylujú špecifické tyrozínové zvyšky cytokínových receptorov, čo má za následok fosforyláciu ďalších signálnych molekúl vrátane STAT (signálny transduktor a aktivátor transkripcie), fosfatidylinozitol-3-kinázy (PI3K), proteínkinázy B (známej tiež ako AKT) a MAPK (proteínkináza aktivovaná mitogénom)⁽⁴⁾. JAK2 kináza je zapojená do signálnej dráhy receptorov hematopoetických rastových faktorov, ako je napr. trombopoetínový receptor, receptor pre erytropoetín a mnohé ďalšie. Tyrozínkináza JAK2 je aktivovaná celou škálou špecifických cytokínov a pôsobí ako aktivátor JAK/STAT signálnej dráhy, ktorá následne reguluje bunkovú proliferáciu a diferenciáciu najmä hematopoetických a imunitných buniek⁽⁵⁾.

V patogenéze myeloproliferatívnych neoplázií sa najčastejšie vyskytuje somatická mutácia JAK2 génu vedúca k zámene bázy G za T na nukleotide 1849 v exóne 14 pseudokinázovej domény JH2, čo predstavuje zámenu aminokyseliny valín za fenylalanín v kodóne 617 (JAK2^{V617F})^(6,7). Mutácia ve-

Obrázok 1. Zastúpenie JAK2, MPL a CALR mutácií v Ph-myeloproliferatívnych neopláziách⁽³⁾.



die ku konštitutívnej aktivácii JAK2 s následnou hypersenzitivitou na cytokíny a k aktivácii cytokínových receptorov nezávisle od väzby ligandu, a teda k nekontrolovanej hematoetickéj transformácii a proliferácii⁽⁶⁾.

Na báze mutácie JAK2^{V617F} a deregulácie JAK/STAT kaskády je objasnených približne 60 % BCR-ABL negatívnych MPN⁽⁷⁾. Frekvencia homozygotných mutácií JAK2 varíruje medzi 25 – 30 % v prípade PV a PMF, zatiaľ čo pri ET je zastúpenie homozygotných mutácií raritné a predstavuje približne 2-4 % všetkých prípadov ET. Prítomnosť homozygotných mutácií pri PV a ET je asociovaná s vyšším rizikom progresie do myelofibrózy⁽⁸⁾.

MPL

Napriek tomu, že v myeloproliferatívnych neopláziách dominuje mutácia JAK2^{V617F}, s nižšou frekvenciou sa vyskytujú aj mutácie iných génov spriahnutých s myeloproliferáciami. Jednou z nich je mutácia v géne MPL, ktorý kóduje trombopoetínový receptor (MPL) viažuci na seba trombopoetín (TPO). Ich väzba vedie k homodimerizácii receptora, aktivácii JAK2, fosforylácii MPL a stimulácii signalizačnej kaskády JAK/STAT, regulujúcej proliferáciu a diferenciáciu buniek⁽⁹⁾.

Doposiaľ bolo identifikovaných viacero mutácií MPL génu, pričom dve najčastejšie, t. j. mutácia v kodóne 515, označovaná ako MPL^{W515L} (zámena tryptofánu za leucín) a MPL^{W515K} (zámena tryptofánu za lyzín), sa vyskytujú v exóne 10. Výsledným efektom MPL mutácií je aktivácia trombopoetínového receptora bez prítomnosti ligandu. Výsledkom je mobilizácia tyrozínkináz a stimulácia JAK/STAT signálnej cesty⁽¹⁰⁾. Mutácie sú väčšinou v heterozygotnom stave, homozygotný stav sa spája s progresiou ochorenia a fibrózou kostnej drene⁽¹¹⁾.

Prítomnosť MPL mutácií súvisí s ET a PMF, preto sa diagnostika daných mutácií odporúča u pacientov s negatívnou mutáciou JAK2^{V617F}. V raritných prípadoch bola preukázaná prítomnosť oboch typov, t. j. MPL i JAK2^{V617F} mutácií⁽¹²⁾.

Kalretikulín

V roku 2013 bol identifikovaný gén kódujúci kalretikulín (CALR), ktorého mutácie boli zistené u pacientov s myeloproliferatívnymi neopláziami, vykazujúcich JAK2 negativitu, v 25 % u pacientov s ET a v 36 % s PMF^(13,14). V súčasnosti je známych približne 50 typov mutácií CALR, hoci až 80 % zo všetkých predstavujú dve najčastejšie, t. j. delécia 52bp (del52; c.1092_1143del; L367fs*46) a inzercia 5bp (ins5; c.1154_1155insTTGTC; K385fs*47), označované aj ako typ 1 a typ 2.

Predpokladá sa, že mutácie CALR zohrávajú kľúčovú úlohu vo vývoji MPN aktiváciou MPL cez JAK/STAT signálnu cestu⁽¹⁵⁾. Mutácie CALR typu 1 sa vyskytujú častejšie v PMF a sú spojené s priaznivejšou prognózou, predĺženým celkovým prežívaním v porovnaní s inými formami PMF, pri ktorých nie je prítomná mutácia CALR. Naopak, mutácie typu 2 sú viac zastúpené pri ET a fenotypovo sú porovnateľné s JAK2^{V617F} mutáciou⁽¹⁶⁾. Pacienti s ET a mutáciou CALR typu 2 majú vyššie množstvo trombocytov. Riziko progresie ET do myelofibrózy je zvýšené pri mutáciách typu 1⁽¹⁶⁾.

Prídavné mutácie myeloproliferatívnych neoplázií

Ako prídavné mutácie sa označujú tie, ktoré nespádajú do kategórie kľúčových mutácií sprevádzajúcich ochorenie MPN, teda mutácie iné než v génoch JAK2, MPL ale

Tabuľka 2. Frekvencia kľúčových a prídavných mutácií v myeloproliferatívnych neopláziách a ich vplyv na leukemickú transformáciu⁽¹⁹⁾.

Mutačná skupina	Gén	PV	ET	PMF	LT
„Driver“ mutácie	JAK2	98 %	52 %	62 %	60 %
	CALR	0 %	26 %	22 %	21 %
	MPL	0 %	4 %	5 %	13 %
Metylácia DNA	TET2	22 %	16 %	15 %	19 %
	DNMT3A	2 %	6 %	9 %	3 %
	IDH1	0 %	0 %	2 %	12 %
	IDH2	2 %	1 %	-	7 %
Modifikácia chromatinu	ASXL1	12 %	11 %	48 %	47 %
	EZH2	0 %	3 %	6 %	15 %
Spliceozómový komplex	SRSF2	3 %	2 %	14 %	13 %
	U2AF1	0 %	1 %	17 %	5 %
	SF3B1	3 %	5 %	13 %	7 %
Tumorsupresory	TP53	1 %	2 %	6 %	16 %
Regulátory transkripcie	RUNX1	2 %	2 %	3 %	17 %

Skratky: PV – polycytémia vera, ET – esenciálna trombocytémia, PMF – primárna myelofibróza, LT – leukemická transformácia

bo CALR⁽¹⁷⁾. Mutácie boli roztriedené do kategórií podľa ich hlavnej funkcie, t. j. na modifikátory chromatinu, komponenty spliceozómového komplexu, modifikátory DNA metylácie, tumorsupresory a regulátory transkripcie. Tieto mutácie majú jednoznačne patogénny charakter, zapájajú sa do progresie ochorenia, leukemickej transformácie, vo zvýšenej miere sú exprimované v blastovej fáze MPN a negatívne ovplyvňujú prežívanie pacientov s MPN⁽¹⁸⁾. Frekvencia a zastúpenie mutácií sú znázornené v tabuľke 2.

Záver

Vďaka objavom mutačných zmien a ovplyvneniu JAK/STAT signálnej cesty v poslednom desaťročí nastal výrazný pokrok v poznaní patofyziológie a diagnostiky MPN. Hoci v súčasnosti existujú možnosti liečby, ktoré sú schopné do určitej miery kontrolovať priebeh ochorenia, stále absentuje „game changer“, ktorý by bol schopný eliminovať ochorenie u väčšiny pacientov. Leukemická transformácia zostáva naďalej hlavnou komplikáciou MPN. Hoci na jednej strane dokážeme identifikovať riziká transformácie, na strane druhej stále nedokážeme zabrániť prechodu do akútnej leukémie v špecifickej skupine pacientov s MPN. Diferenciálna diagnostika podtypov MPN je kľúčová pre správny monitoring pacientov a znamená úzku spoluprácu klinikov, genetikov a patológov. Pohľad na klinický priebeh ochorenia je významný aj vzhľadom na manažment špeciálnych situácií, ako je predkoncepčná starostlivosť, gravidita či predoperačná starostlivosť.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Dlhodobý strategický výskum a vývoj zameraný na výskyt Lynchovho syndrómu v populácii SR a možnosti prevencie nádorov spojených s týmto syndrómom, kód ITMS: 313011V578, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

1. Loscocco GG, Guglielmelli P, Vannucchi AM. Impact of Mutational Profile on the Management of Myeloproliferative Neoplasms: A Short Review of the Emerging Data. *Onco Targets Ther.* 2020; 13: 12367-12382.
2. Rampal R, Ahn J, Abdel-Wahab O, et al. Genomic and functional analysis of leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *Proc Natl Acad Sci.* 2014; 111: E5401-5410
3. Prins D, Arias CG, Klampfl T, et al. Mutant Calreticulin in the Myeloproliferative Neoplasms. *Hemasphere.* 2020; 4: e333
4. Sandberg EM, Wallace TA, Godeny MD, et al. JAK2 tyrosine kinase: a true jak of all trades? *Cell Biochem Biophys.* 2004; 41: 207-232
5. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell.* 2005; 7: 387-397
6. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet.* 2005; 365: 1054-1061
7. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.* 2005; 352: 1779-1790
8. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Clinical profile of homozygous JAK2 617 V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood.* 2007; 110:840-846
9. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2017; 129: 667-679
10. Arunachalam AK, Suresh H, Mathews V, et al. Allele specific PCR: a cost effective screening method for MPL mutations in myeloproliferative neoplasms. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2018; 1543-1545
11. Rumi E, Pietra D, Guglielmelli P, et al. Acquired copy-neutral loss of heterozygosity of chromosome 1p as a molecular event associated with marrow fibrosis in MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2013; 121: 4388-4395
12. Furtado LV, Weigelin HC, Elenitoba-Johnson SJ, et al. Detection of MPL mutations by a novel allele-specific PCR-based strategy. *J Mol Diagn.* 2013; 15: 810-818
13. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med.* 2013; 369: 2379-2390
14. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med.* 2013; 2391-2405
15. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2016; 127: 1307-1316
16. Pietra D, Rumi E, Ferretti VV, et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2016; 30: 431-438
17. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2014; 123: 2220-2228
18. Chen E, Schneider RK, Breyfogle LJ, et al. Distinct effects of concomitant Jak2V617F expression and Tet2 loss in mice promote disease progression in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2015; 125: 327-335
19. Grabek J, Straube J, Bywater M, et al. The Molecular Drivers of Disease Initiation, Progression and Transformation and their Effect on Treatment. *Cells.* 2020; 9: 1901

RNDr. Miroslava Eckertová, PhD.

Lekárska genetika, Medirex, a. s.

Galvaniho17/C, 820 16 Bratislava

e-mail: miroslava.eckertova@medirex.sk